

# P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) 抑制による肥満におけるインスリン抵抗性の改善効果

佐藤 千景

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 糖尿病性腎症治療学

キーワード：メタボリックシンドローム、インスリン抵抗性、接着分子、PSGL-1

## P-selectin glycoprotein ligand-1 deficiency is protective against obesity-related insulin resistance

Chikage Sato

Department of Diabetic Nephropathy, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

### 緒 言

近年、食習慣の変化や運動不足により肥満が増加しているが、メタボリックシンドロームとは、内臓脂肪の蓄積がその最上流に位置し、肥満によって生じたインスリン抵抗性により、糖尿病、高脂血症、高血圧が生じ、これらの疾患が重積することにより動脈硬化の発症・進展に大きく関与することが病態の基盤となっている（図1）。さらに、内臓脂肪型肥満は脂肪組織での炎症がインスリン抵抗性に密接に関係していることが明らかになってきた<sup>1)</sup>。脂肪組織のマクロファージの蓄積は、人およびげっ歯類において体重と正相関しており、内臓脂肪組織中のマクロファージは、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1（monocyte chemoattractant protein-1）などを含む様々な炎症性サイトカインやケモカインを

分泌し、インスリン抵抗性を増強させている<sup>2,3)</sup>。高脂肪食負荷により肥満を誘導した MCP-1 欠損マウス<sup>4)</sup>や CCR2（C-C chemokine receptor 2）欠損マウスでは<sup>5)</sup>、内臓脂肪組織中のマクロファージ蓄積や、インスリン抵抗性が改善し、逆に MCP-1 を過剰発現させると内臓脂肪組織中のマクロファージが増加し、イン

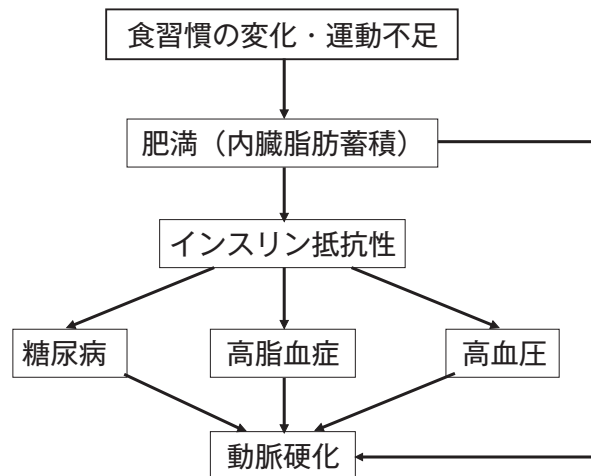


図1 メタボリックシンドロームの病態

平成23年7月受理  
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1  
電話：086-235-7234 FAX：086-222-5214  
E-mail：c-sato@md.okayama-u.ac.jp

### プロフィール



昭和48年5月23日生

平成11年3月

平成16年4月

平成17年10月

平成20年4月

愛媛大学医学部卒業

岡山大学医学部・歯学部附属病院腎臓・糖尿病・内分泌内科 医員

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学 研究生

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科糖尿病性腎症治療学講座 助教

現在に至る

スリン抵抗性を促進する<sup>4,6)</sup>。これらの結果から、内臓脂肪組織中のマクロファージは肥満に伴うインスリン抵抗性に強く関与していることが示唆される。

一般に、単球/マクロファージの炎症組織への浸潤は、ケモカインや内皮細胞や単球上に発現する接着分子によって誘導され、rolling, sticking, migrationのステップがあり、それぞれに接着分子が関与している<sup>7)</sup>。以前に、我々は糖尿病性腎症の病態には炎症のプロセスが関与しており、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) 欠損の糖尿病マウスでは、血糖とは関係なく腎障害が抑制されることを報告した<sup>8)</sup>。

しかし、単球が肥満の脂肪組織に浸潤する接着経路は不明であるため、我々はふたつの肥満モデルマウスを用いて、内臓脂肪組織の接着分子遺伝子発現をDNA マイクロアレイにてスクリーニングし、候補遺伝子のノックアウトマウスを用いてその機能について検討を行った。

## 材料と方法

### 1. 実験プロトコール

#### 1) 実験 1

8 週齢の雄性 db/db マウスと wild type (WT: C57/BL6) マウス各10匹より採血および精巣周囲白色脂肪組織を採取。

#### 2) 実験 2

雄性 C57/BL6 マウスを、7 から19週齢まで脂肪分 60%kcal の高脂肪食 (10匹) または10%kcal の低脂肪食 (9 匹) で飼育。腹腔内ブドウ糖およびインスリン負荷試験を施行し、19週齢で採血し精巣周囲白色脂肪組織を採取。

#### 3) 実験 3

P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) ホモ接合性ノックアウトマウスと WT (C57/BL6) マウスに、7 から17週齢まで高脂肪食を負荷。腹腔内ブドウ糖およびインスリン負荷試験を施行し、17週齢で採血し精巣周囲白色脂肪および肝臓組織を採取。

### 2. DNA マイクロアレイ

実験 1, 2 で採取した脂肪組織より RNA を抽出し標識 cRNA を作製。Affymetrix 社 Mouse Genome 430 2.0 DNA チップでハイブリダイゼーションを行い、対照群に比し 2 倍以上に発現している遺伝子群を機能解析する。

### 3. フローサイトメトリー

10週齢の db/db マウスと WT マウスの各末梢血を、LSM を用いて比重遠心法にて単球を分離する。また、精巣周囲白色脂肪組織をコラゲナーゼ処理にて分解し、間質血管細胞群を遠心分離する。分離した各細胞を PSGL-1 (PE)-F4/80 (FITC) および PSGL-1 (PE)-CD31 (FITC) の各蛍光抗体で二重染色し、FACS caliber で解析する。

### 4. インスリン刺激による Akt リン酸化

実験 3 の高脂肪食負荷 PSGL-1 欠損マウスおよび WT マウスに、麻酔下で下大静脈よりインスリン 5 単位/body を静注し、5 分後に大腿筋と肝臓組織を採取。各々より蛋白を抽出し、Akt およびリン酸化 Akt 抗体にてウェスタンブロットで解析する。

## 結 果

### 1. db/db マウスの内臓脂肪組織で PSGL-1 発現が増加する

実験 1 では、db/db マウスは HbA1c に差は認めず、体重、精巣周囲白色脂肪重量や血清 LDL、随時血糖、血漿インスリンは WT マウスより増加していた (図 2 A)。

精巣周囲白色脂肪の DNA マイクロアレイでは、db/db マウスで発現が増加している 1080 遺伝子のうち、PSGL-1 を含む 47 の細胞接着関連遺伝子を認めた。我々は、PSGL-1 が白血球と血管内皮細胞の両方に存在しており、3 種のセレクトインと広く結合が可能なことから、この分子に着目した。さらに、定量 PCR では PSGL-1, F4/80, MCP-1, P-selectin の発現が db/db マウス脂肪組織で増加しており (図 2 B)、蛍光抗体二重染色にて内臓脂肪組織においても白血球と血管内皮細胞の両方に PSGL-1 が存在することを確認した (図 2 C, D)。

フローサイトメトリーにて、末梢血および間質血管細胞群の F4/80<sup>+</sup>/PSGL-1<sup>+</sup> 細胞は、両群で差はみられなかったが、間質血管細胞群の CD31<sup>+</sup>/PSGL-1<sup>+</sup> 細胞は db/db マウスで増加しており、肥満した内臓脂肪組織では、血管内皮細胞上の PSGL-1 の発現が有意に増加することを確認した (図 2 E-G)。

### 2. 高脂肪食負荷マウスの内臓脂肪組織で PSGL-1 発現が増加する

実験 2 では、BL6 マウスに低脂肪食または高脂肪食を負荷し、高脂肪食群では、体重、精巣周囲白色脂肪

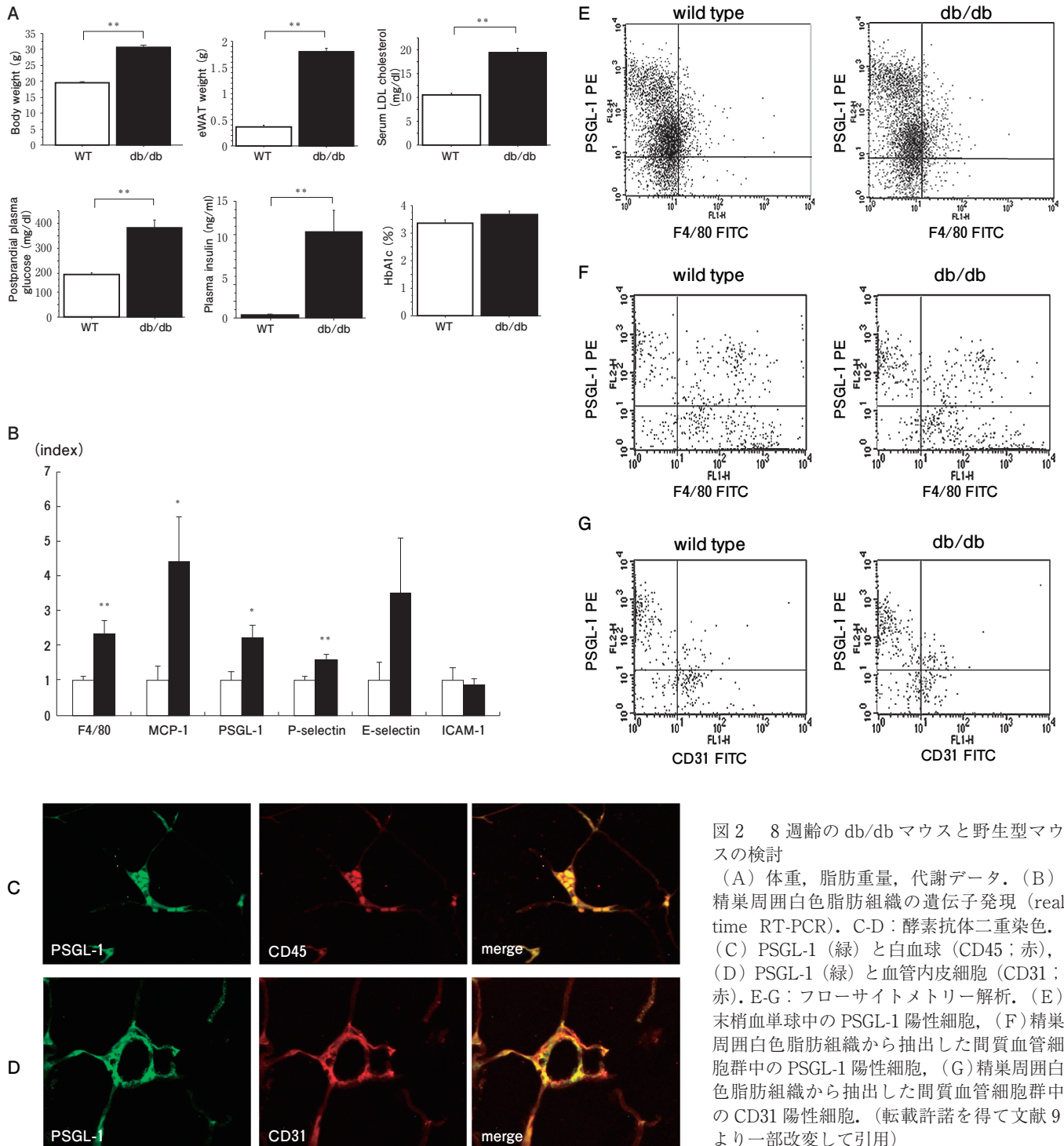


図2 8週齢のdb/dbマウスと野生型マウスの検討

(A) 体重、脂肪重量、代謝データ。(B) 精巣周囲白色脂肪組織の遺伝子発現 (real time RT-PCR)。C-D: 酵素抗体二重染色。(C) PSGL-1 (緑) と白血球 (CD45; 赤)。(D) PSGL-1 (緑) と血管内皮細胞 (CD31; 赤)。E-G: フローサイトメトリー解析。(E) 末梢血単球中の PSGL-1 陽性細胞。(F) 精巣周囲白色脂肪組織から抽出した間質血管細胞群中の PSGL-1 陽性細胞。(G) 精巣周囲白色脂肪組織から抽出した間質血管細胞群中の CD31 陽性細胞。(転載許諾を得て文献 9 より一部改変して引用)

重量、血清 LDL、空腹時血糖、空腹時血漿インスリン、HbA1c が増加していた (図 3 A)。精巣周囲白色脂肪の DNA マイクロアレイおよび定量 PCR で、db/db マウスと同様に高脂肪食群で PSGL-1 の発現増加を認めた (図 3 B)。

### 3. 高脂肪食負荷 PSGL-1 欠損マウスでインスリン抵抗性および感受性が改善する

実験 3 では、高脂肪食負荷 PSGL-1 欠損マウスと WT マウスにおいて、体重、脂肪重量体重比、摂餌量、空腹時血糖、HbA1c に差は見られなかったが (図 4 A)、腹腔内糖 (ブドウ糖 1.2 g/kg) およびインスリン

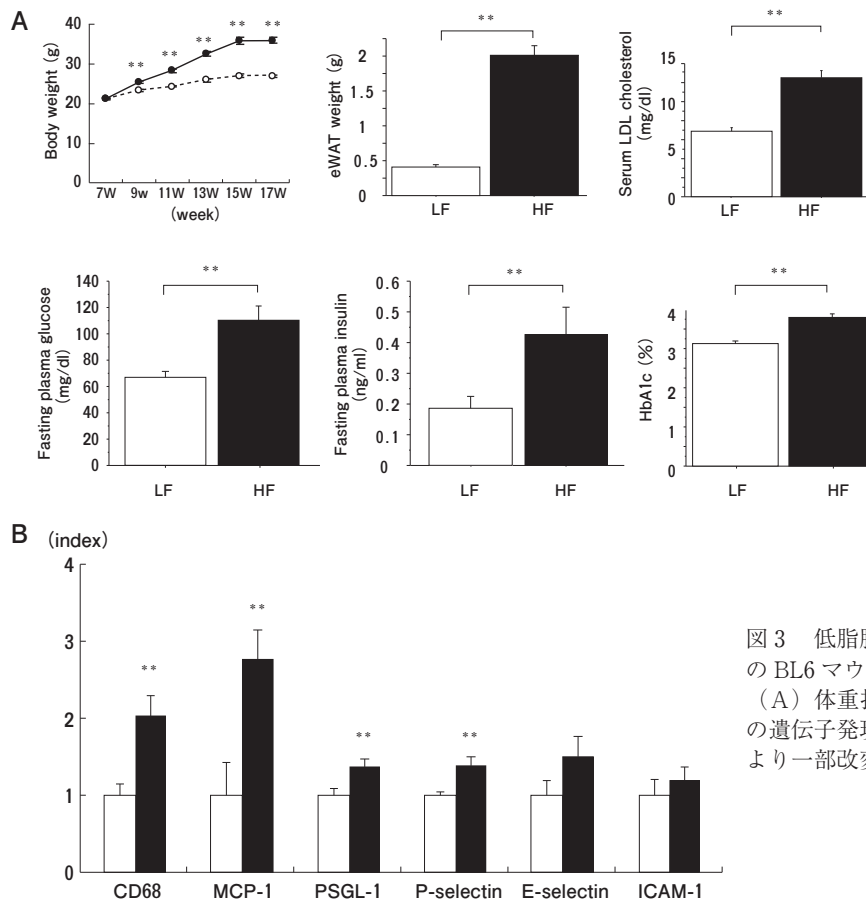


図3 低脂肪食 (LF) または高脂肪食 (HF) 12週間負荷後の BL6 マウスの検討

(A) 体重推移, 代謝データ. (B) 精巣周囲白色脂肪組織の遺伝子発現 (real time RT-PCR). (転載許諾を得て文献 9 より一部改変して引用)

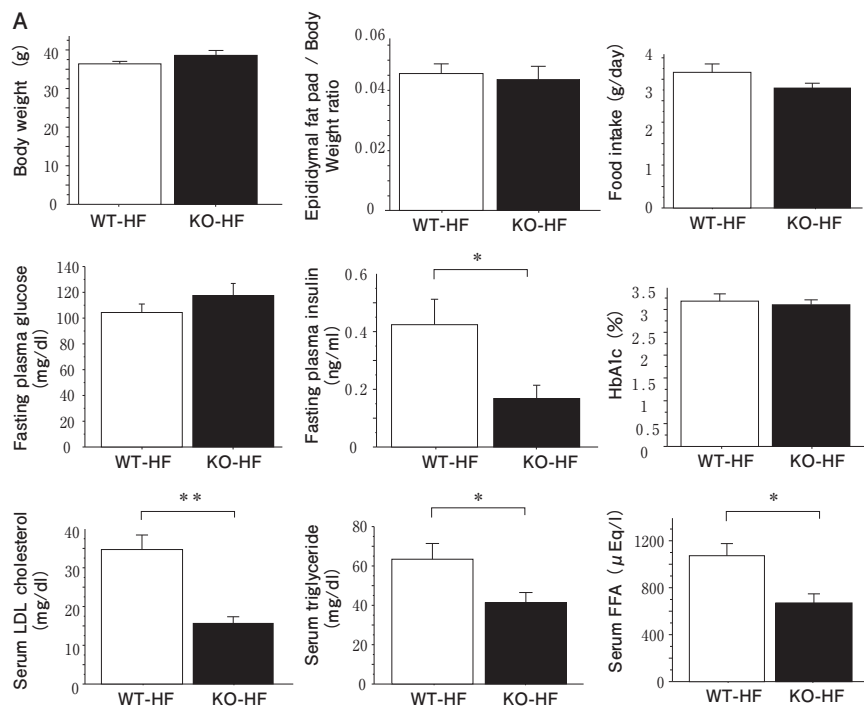


図4 高脂肪食10週間負荷後の野生型マウス (WT-HF) と PSGL-1 ノックアウトマウス (KO-HF) の検討

(A) 体重, 脂肪重量, 代謝データ. (B) 腹腔内糖負荷試験. (C) インスリン負荷試験. (転載許諾を得て文献 9 より一部改変して引用)



(ヒューマリン R 0.7 単位/kg) 負荷試験において、PSGL-1 欠損マウスでインスリン抵抗性および感受性の改善を認めた (図 4 B, C). また血清 LDL, 中性脂肪, 遊離脂肪酸も PSGL-1 欠損マウスで改善を認めた. これらの結果は, PSGL-1 欠損が体重や脂肪重量に関係なく, インスリン抵抗性や脂質代謝を改善させることを示している.

さらに PSGL-1 欠損マウスでは, 脂肪細胞サイズが減少し (図 5 A, B), マクロファージ浸潤も減少していた (図 5 C). 脂肪組織における F4/80, MCP-1, IL-6, iNOS, leptin の mRNA 発現も PSGL-1 欠損マウス

で低下していたが, 非活性化マクロファージマーカーである IL-10 や LPL mRNA は PSGL-1 欠損マウスで増加し, 活性化マクロファージマーカーである CD11c mRNA は低下する傾向にあった (図 5 D). インスリンシグナルの検討では, 肝臓では変化はなかったが, 筋肉において PSGL-1 欠損マウスでインスリン刺激による Akt リン酸化の増強を認めた (図 5 E).

肥満による脂肪肝に関しては, 肝重量の減少と肝臓の中性脂肪含量も低下する傾向にあり (図 6 A), 組織学的にも PSGL-1 欠損マウスにおいて脂肪肝の改善がみられた (図 6 B).

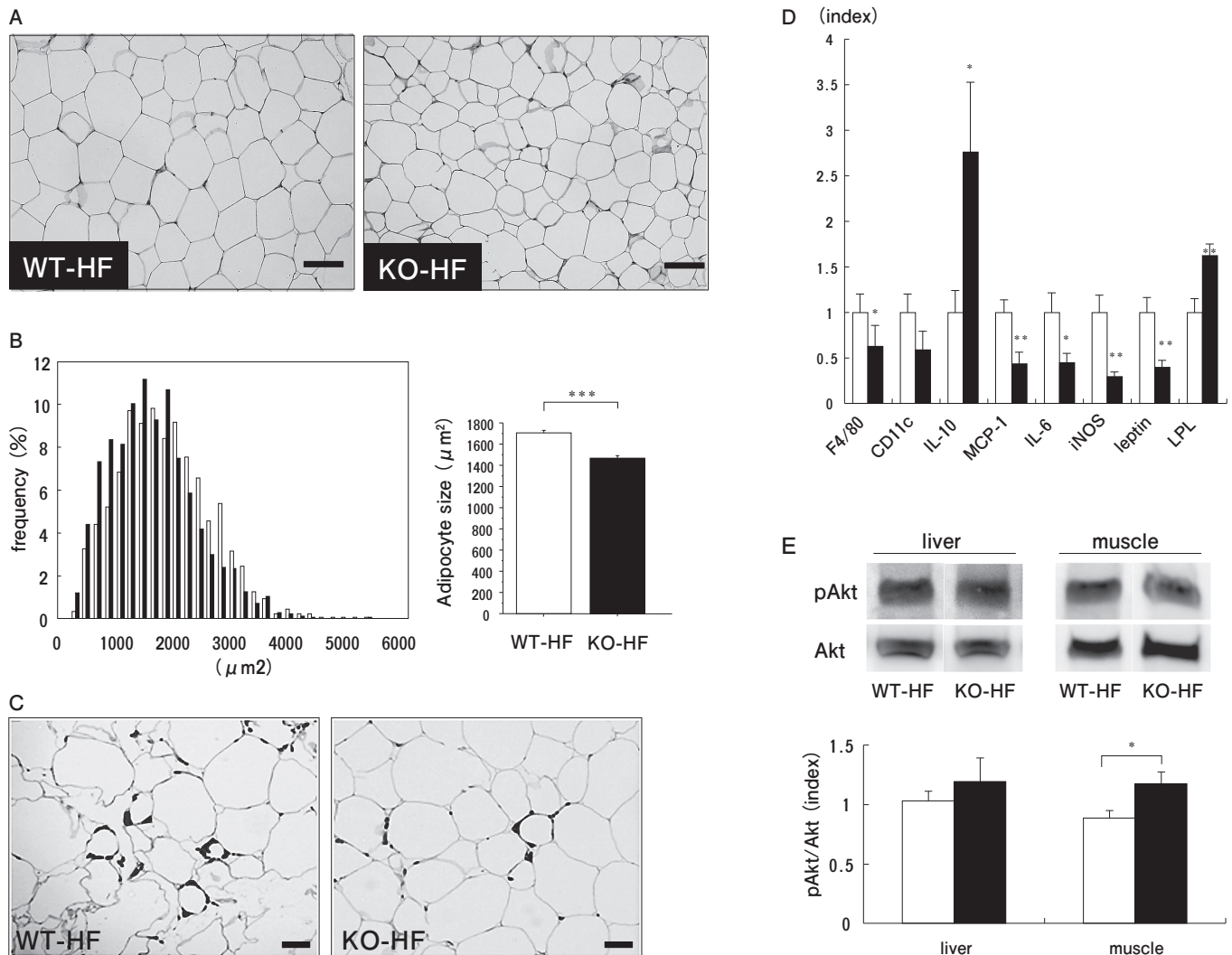


図 5 A-D: 高脂肪食10週間負荷後の PSGL-1 ノックアウト (KO-HF) マウスの精巣周囲白色脂肪組織 (eWAT) では野生型マウス (WT-HF) に比し炎症が改善する

(A) 精巣周囲白色脂肪組織の PAS 染色. (B) 精巣周囲白色脂肪組織の面積のヒストグラム. (C) KO-HF マウスでは WT-HF マウスに比し eWAT 中のマクロファージが減少する. (D) 精巣周囲白色脂肪組織の遺伝子発現 (real time RT-PCR). (E) 肝臓および筋肉におけるインスリン刺激によるインスリンシグナル. (転載許諾を得て文献 9 より一部改変して引用)

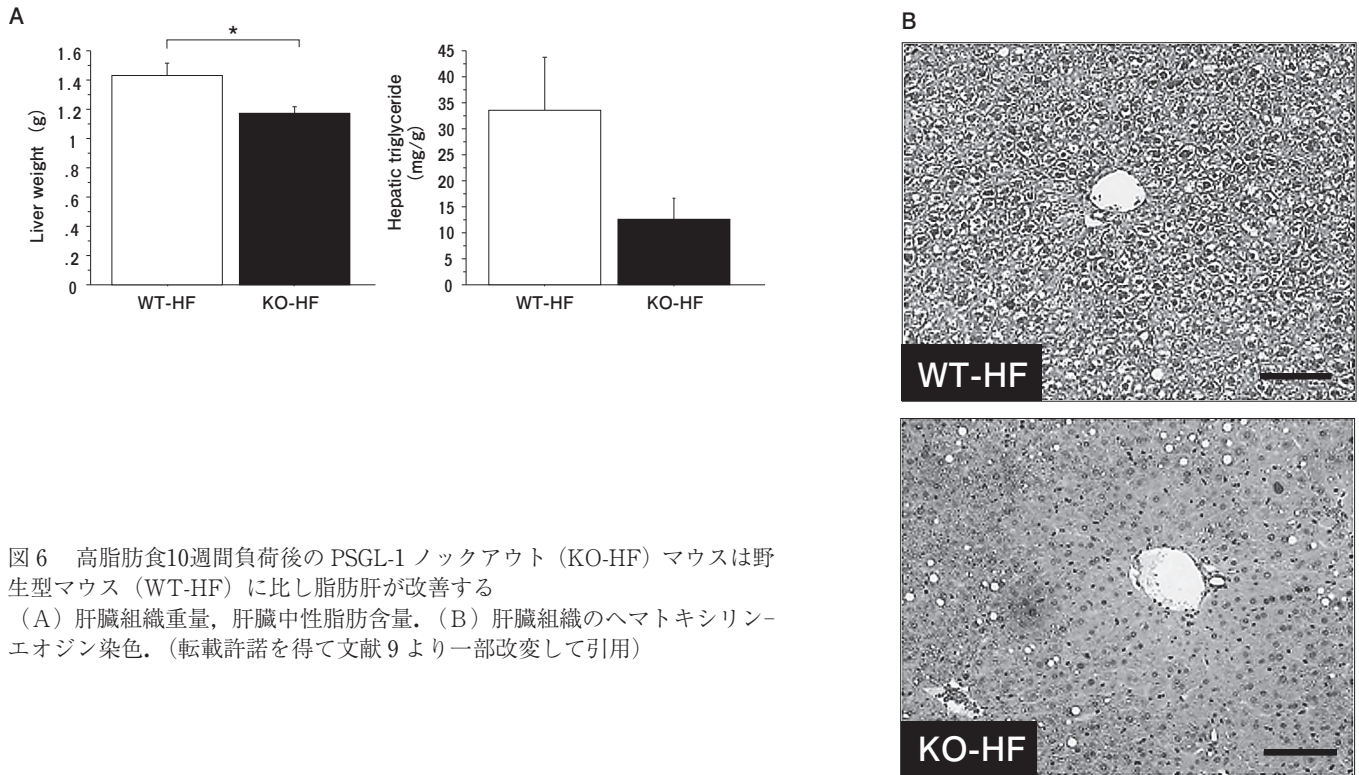


図6 高脂肪食10週間負荷後のPSGL-1ノックアウト(KO-HF)マウスは野生型マウス(WT-HF)に比し脂肪肝が改善する

(A) 肝臓組織重量, 肝臓中性脂肪含量. (B) 肝臓組織のヘマトキシリン-エオジン染色. (転載許諾を得て文献9より一部改変して引用)

## 考 察

内臓脂肪組織へ単球/マクロファージが浸潤するメカニズムを解明するため, 我われはdb/dbマウスと高脂肪食負荷マウスの内臓脂肪について, 両モデルとも比較的早期の耐糖能障害の状態で検討を行い, 肥満した内臓脂肪組織におけるPSGL-1の発現増加を確認した. さらにPSGL-1欠損マウスに高脂肪食を負荷した結果, 内臓脂肪へのマクロファージの浸潤やインスリン抵抗性, 脂質代謝, 脂肪肝の改善を認めた.

PSGL-1はP-selectinの機能的リガンドとしてクローニングされた接着分子であるが<sup>10)</sup>, P, E, L-セレクチンすべてに結合する. ムチン様糖鎖をもち, 白血球や内皮細胞上に存在し, 血小板-白血球, 内皮-白血球の結合に関与している. PSGL-1は, 様々な組織に発現しているが, 造血細胞上に多く発現しているほか, 脂肪組織や脳にも多く発現している<sup>11)</sup>.

今回フローサイトメトリーの結果から, 血管内皮細胞上のPSGL-1の発現増加が, 肥満した内臓脂肪組織へのマクロファージ浸潤や炎症に関与していることが示唆された.

最近では, 肥満の脂肪組織ではマクロファージの極性が, 抗炎症性に働く非活性化M2マクロファージか

ら炎症性に働く活性化M1マクロファージに変化すると報告されている<sup>12)</sup>. 今回PSGL-1の欠損は, 脂肪組織中のマクロファージを減少させるだけではなく, フェノタイプをM1からM2に変化させることにより, 内臓脂肪組織における炎症を抑制すると考えられた. さらに, 筋肉でのインスリンシグナルの改善が, 全身のインスリン感受性を改善したと考えられる.

また, 高脂肪食負荷PSGL-1欠損マウスにおける脂質代謝および脂肪肝の改善は, インスリン抵抗性が改善したことにより脂肪組織のLPL活性が改善し, 全身の脂質代謝が改善した可能性が考えられた.

## 結 論

今回の結果は, PSGL-1が肥満マウスの脂肪組織にマクロファージが浸潤する際に極めて重要な接着分子であることを示唆している. PSGL-1は肥満に伴うインスリン抵抗性を予防する新規ターゲットの候補になると考えられる.

## 文 献

- 1) Wellen KE, Hotamisligil GS: Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* (2005) 115, 1111-1119.
- 2) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel

- RL, Ferrante AW Jr : Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* (2003) 112, 1796-1808.
- 3) Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H : Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* (2003) 112, 1821-1830.
- 4) Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M : MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* (2006) 116, 1494-1505.
- 5) Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW Jr : CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* (2006) 116, 115-124.
- 6) Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kawatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, et al. : Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* (2006) 281, 26602-26614.
- 7) Bevilacqua MP, Nelson RM : Selectins. *J Clin Invest* (1993) 91, 379-387.
- 8) Inoue T, Tsuzuki Y, Matsuzaki K, Matsunaga H, Miyazaki J, Hokari R, Okada Y, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Matsumoto S, Miura S : Blockade of PSGL-1 attenuates CD14+ monocytic cell recruitment in intestinal mucosa and ameliorates ileitis in SAMP1/Yit mice. *J Leukoc Biol* (2005) 77, 287-295.
- 9) Sato C, Shikata K, Hirota D, Sasaki M, Nishishita S, Miyamoto S, Kodera R, Ogawa D, Tone A, Kataoka HU, Wada J, Kajitani N, et al. : P-selectin glycoprotein ligand-1 deficiency is protective against obesity-related insulin resistance. *Diabetes* (2011) 60, 189-199.
- 10) Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B, Dale AC, Glenn RL : Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* (1993) 75, 1179-1186.
- 11) Yang J, Galipeau J, Kozak CA, Furie BC, Furie B : Mouse P-selectin glycoprotein ligand-1 : molecular cloning, chromosomal localization, and expression of a functional P-selectin receptor. *Blood* (1996) 87, 4176-4186.
- 12) Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR : Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* (2007) 117, 175-184.